

EINE STUDIE ZUR SCHWANGERSCHAFTSGINGIVITIS
Untersuchungen über die Wirkung der Hormone Östradiol
und Progesteron auf menschliche Gingiva- und
Hautfibroblastenkulturen

EDELTRAUD ASSMANN-MIRWALD

1986

*Diss.
München*

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
(Direktor: Professor Dr. E. Sonnabend)
der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der
Universität München

Eine Studie zur Schwangerschaftsgingivitis

(Untersuchungen über die Wirkung der Hormone
Östradiol und Progesteron auf menschliche
Gingiva- und Hautfibroblastenkulturen)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde

an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Edeltraud Assmann-Mirwald

aus

Radautz/Rumänien

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med.dent.E.Sonnabend

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof.Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.3.1986

Herrn Prof. Dr. E. Sonnabend danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine verständnisvolle Beratung und Unterstützung.

Besonders danken möchte ich Frau Dipl.chem., Dr.med.dent B. Willershausen-Zönnchen, für die theoretische und praktische Unterweisung bei den Experimenten und den hilfreichen Diskussionen.

INHALTSVERZEICHNIS

A.	Einleitung	6
I.	Problemstellung Schwangerschaftsgingivitis	6
II.	Einfluß der Östrogene	8
III.	Einfluß des Progesterons	9
IV.	Klinische Einteilung der Schwangerschafts- bedingten Veränderungen an der Gingiva	10
V.	Ziel der Arbeit	13
B.	Experimenteller Teil	14
I.	Physiologische Grundlagen	14
II.	Allgemeine Kulturbedingungen	17
III.	Entnahme der Gewebsproben	20
IV.	Anlegen der Fibroblastenkulturen	21
V.	Versuche mit den Sexualhormonen	23

C.	Ergebnisse der Versuchsreihen	31
I.	Einfluß von Östradiol	31
II.	Einfluß von Progesteron	31
III.	Einfluß der Hormone Östradiol und Progesteron in Kombination	32
D.	Kritische Schlußbetrachtungen	40
E.	Zusammenfassung	43
F.	Literatur	45
G.	Lebenslauf	53

A. Einleitung

I. Problemstellung Schwangerschaftsgingivitis

Seit Ende des vorigen Jahrhunderts haben viele Autoren Mundschleimhautveränderungen, die im Zusammenhang mit der Schwangerschaft auftraten, beschrieben. BETHMANN (7) führt 71 Autoren auf, welche das Bestehen dieser Krankheit bekräftigen. LÖE und SILNESS (34) wiesen 1963 darauf hin, daß der Schweregrad der Gingivaentzündung bei Frauen signifikant größer sei.

Das Krankheitsbild der Gingivitis Gravidarum, als eine von anderen Zahnfleischentzündungen differenzierbare Form, ist unbestritten. Über Häufigkeit, Intensität und Pathogenese sind die Meinungen geteilt. In der Literatur werden widersprüchliche Ansichten vertreten, ob lokale Faktoren oder hormonelle Reize für die Schleimhautveränderungen verantwortlich sind.

Die ersten Anzeichen dafür, daß die Gingiva ein besonders feiner Indikator für exogene Reize und endogene Einflüsse darstellt, treten nach HUBER (22) in der ersten Hälfte der Gravidität auf. Nach MÜHLEMANN (4) kann nur eine langdauernde Östrogeneinwirkung eine Schwangerschaftsgingivitis auslösen. Diese ist frühestens nach der achten Woche möglich. LÖE (33) fand die Auswirkung der Gravidität auf das Zahnfleisch frühestens im zweiten Monat. Daß sich mit fortschreitender Gravidität die Ausprägung der Krankheitsbilder verstärkt, beschreiben SCHMIDT (46), HAIM (17) und andere.

Die Anzahl der Frauen, welche Gingivaveränderungen in der Gravidität aufweisen, wird von einzelnen Autoren unterschiedlich angegeben. PINARD (42) gab die Häufigkeit mit 60% an, BIRO (8) schloß alle mit Zahnstein und Konkrementen behafteten Fälle aus und fand bei 38% Schwangeren eine Gingivitis.

MAIER, ORBAN (35), LÖE und SILNESS (34) sind der Ansicht, daß Schwangere und Nichtschwangere die gleiche Gingivitishäufigkeit aufweisen, jedoch erstere stärkeren Grades. FESSELER (14) sieht in der Zunahme der SFF einen Parameter für die Wirkung weiblicher Sexualhormone auf die Gingiva.

Vom ersten Tag der Gestation an, setzt eine Vermehrung des Progesterons ein. Ab Mens II wird die Produktion des Östrogens von der Placenta übernommen. Damit erfährt der Östrogenspiegel einen raschen Anstieg. Das führt am Uterus zu einer Auflockerung des Gewebes und zu einer Vergrößerung des Organs. In ähnlicher Weise treten auch Veränderungen an der Gingiva auf. Das Zahnfleisch schwangerer Frauen zeigt neben Hyperämie, verstärkter Blutungs- und Entzündungsneigung ebenfalls Volumenzunahme durch Flüssigkeitseinlagerung und Faser Vermehrung. Die Einflüsse der weiblichen Sexualhormone auf das Gingivagewebe zeigen sich am eindruckvollsten bei der gingivalen Schwangerschaftshyperplasie. Es kommt zu einer Gewebsvermehrung, die sich aus dem Approximalraum entwickelt und durch ein rasches Wachstum auffällt.

Minimale Reize bewirken dabei massive Blutungen. Die durch die Größenzunahme der Papille bedingten Retentionsnischen führen leicht zu Entzündungen. Histologisch zeigt das Epithel teilweise Proliferation, teilweise degenerative Erscheinungen. Im Bindegewebe finden sich Neubildungen von Faserbündeln und stark vermehrte und teleangiektatisch dilatierte Kapillaren (HAIM 17). Plasmazellen und Lymphocyten häufen sich in den Papillen und um die Gefäße. HAIM (17) hat perivaskuläre Fibringerinnsel licht- und elektronenmikroskopisch bei der Hyperplasia gingivae gravidarum nachgewiesen. GRINDLY (16) fand Hyperplasien bei 26%, MAIER und ORBAN (35) bei 20%, SCHLEGEL und TRIADAN (48) bei 30%.

II. Einfluß der Östrogene

Einen Zusammenhang zwischen Gingiaveränderungen und steigendem Östrogenspiegel konnten ZISKIN (59) und Mitarbeiter 1933 experimentell in Versuchen an Rhesusaffen nachweisen. Nach Injektion von Schwangerenharn entwickelten die Versuchstiere Zahnfleischhyperplasien. MÜHLEMANN (40) beschrieb 1952 den Einfluß weiblicher Sexualhormone auf das Zahnfleisch. Er fand, daß sich das gingivale Oberflächenbild der Gingiva mit dem Zyklusgeschehen verändert. In der Östrogenphase des monatlichen Zyklus beobachtete er eine Zunahme der Keratinisierung der Schleimhaut. In der Progesteronphase nimmt die Verhornung unter vermehrter Desquamation ab. Der Keratinisie-

rungsindex der Gingiva verläuft während des Zyklus kongruent mit dem kernpygnotischen Index des Vaginalabstrichs und der Östrogenausscheidung im Urin.

Die biologische Wirkung von Östrogenen wurde 1961 von DICZFALUSY und LAURITZEN (12) ausführlich beschrieben. "Die Zufuhr von weiblichen Keimdrüsenhormonen wirkt zweifach auf die Bindegewebssubstanz, einmal durch die Verstärkung der kollagenen Fasern, zum anderen durch Vermehrung der Kittsubstanzen und Zunahme ihrer Elastizität".

Fibrocyten, Fibroblasten und Histiozyten treten vermehrt auf, infolge einer Weiterstellung der Endstromgefäße werden Haut, Organe und Gewebeart vermehrt durchblutet. BETHMANN (7) zeigt durch thermoelektrische Messungen an der frontalen Gingiva, daß unter Östrogeneinwirkung die Durchblutung der Gingiva verstärkt ist.

III. Einfluß des Progesterons

Dem Progesteron wird eine antagonistische Wirkung zum Östrogen zugeschrieben.

KUTZLEB (27) erzeugte durch Gaben von Corpus-luteum-Hormon eine Gingivitisform, die er als fibrös, hämorrhagisch und hypertrophierend beschrieb.

In der Kritik dieser Versuche führte HARNDT (19) an, daß nach den Begriffen der allgemeinen Pathologie beide Krankheitsbilder identisch sind.

Nach MÜHLEMANN (40) spielt Progesteron bei der Entstehung von gingivalen Schwangerschaftsveränderungen eine untergeordnete Rolle.

HUGOSON (23) und LINDHE (31) schreiben dem Progesteron eine Störung der Mikrozirkulation durch Mikrothromben und einen Anstieg der Gefäßpermeabilität zu.

IV. Klinische Einteilung der Schwangerschaftsbedingten Veränderungen an der Gingiva

WETZEL (57) unterscheidet:

1. Gingivitis gravidarum simplex
2. Gingivitis gravidarum diffusa
3. Gingivitis gravidarum hypertrophicans

TAMMOSCHEIT (51) nennt eine

1. Gingivitis non specifica
2. Hyperplastische Gingivitis
3. Schwangerschaftstumor

ZISKIN (59) und GRIDLY (16) unterteilen in

1. Die blutende Gingiva
2. Das leichte Giongivaödem
3. Erdbeerrötung der Gingiva
4. Hypertrophische Schwangerschaftsgingivitis
5. Epulis fibrosa

ALLERBECK, SCHLEGEL, TRIADAN (2) unterteilen in:

1. Entzündliches Parodontium
2. Hyperplastisches Parodontium
 - a) Diffus hyperplastisches Parodontium
 - b) Lokalisiertes Hyperplastisches Parodontium
3. Regressive Parodontopathie

Bei MÜHLEMANN (40) "äußern sich die Erscheinungsbilder nach Schwere ihres Ausprägungsgrades"

1. in einen objektiv nicht faßbaren "agacement parodontaire"
2. in einer erhöhten Blutungsbereitschaft des marginalen Zahnfleisches
3. in einer auffälligen Desquamation und himbeerfarbigen Rötung der Gingiva
4. in hypertrophisch- hyperplastischen Verdickungen des marginalen Parodonts
5. in epulisartigen Tumorbildungen
6. in einer Zahnlockerung

SALDEN (45) beschreibt

1. Hyperämie des Zahnfleisches
2. Gingivitis simplex oder marginalis
3. Gingivitis diffusa
4. Gingivitis hypertrophicans
5. Gingivitis hyperplastica

RATEITSCHAK (44) unterscheidet:

1. Leichte Schwangerschaftsgingivitis
2. Schwere Schwangerschaftsgingivitis
3. Epulis gravidarum

V. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluß der Steroidhormone Östradiol und Progesteron an Gingiva- und Hautfibroblastenkulturen untersucht werden.

Die Steroidhormone kontrollieren in der Zelle den Verlauf der DNA-Transkription (5,53).

Die Wirkung von Östradiol und Progesteron auf die DNA-Synthese wird in der nachfolgenden Untersuchung durch den Einbau radioaktiven Thymidins in die DNA verfolgt. Die so markierte DNA, kann in TCA-fällbares Material übergeführt und gemessen werden.

Diese Bestimmung gibt Aufschluß über die Syntheseleistung der Zellkerne, welche durch die Wirkung der Sexualhormone verändert sein kann.

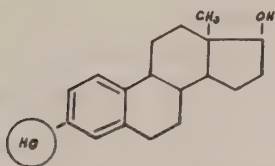
Das Ziel dieser Arbeit ist, die Beeinflussung des Zellwachstums durch Östradiol und Progesteron zu untersuchen. Das Verhalten der Gingivafibroblasten soll dabei mit der Reaktion der Hautfibroblasten verglichen werden.

B. EXPERIMENTELLER Teil

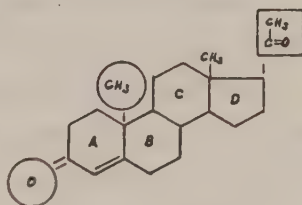
I. Physiologische Grundlagen

Weibliche Sexualhormone gehören zur Gruppe der Steroide. Man bezeichnet sie auch als Ovarialhormone, da sie vom Ovar, bei Schwangeren von der Plazenta und in geringen Mengen von den Nebennieren gebildet werden.

Aufgegliedert werden sie nach ihrer Funktion in Östrogene, mit der wirksamsten Substanz Östradiol und in Gestagene, mit dem Hauptvertreter Progesteron.



Östradiol



Progesteron

Östrogene und Gestagene werden in den Eierstöcken zu bestimmten Phasen des menstruellen Zyklus der Frau gebildet. Östrogene Hormone im engeren Sinne sind Östron, Östradiol und Östriol. Die östrogenen Hormone wirken proliferierend, zellbildend und vergrößernd auf Uterus, Vagina und Brustdrüsen. Die Hormonproduktion unterliegt zyklusbedingt bei der fertilen Frau großen Schwankungen, was auf der nachfolgenden Tabelle gut zu erkennen ist.

Durchschnittliche Sekretionsraten von Östradiol
in mg/d (49)

	Sekretion in (mg/dl)
Menstruationsphase	0,1
Follikelphase	0,2
Ovulation	0,7
Gelbkörperphase	0,3
Schwangerschaft	8-15

Das wirksamste und prozentual häufigste gestagene Hormon ist das Progesteron. Es wird in erster Linie während der Gelbkörperphase des Menstruationszyklus gebildet. Hauptaufgabe des Progesterons ist es, den Genitaltrakt der Frau für die Aufnahme und Reifung des befruchteten Eies vorzubereiten und die Schwangerschaft zu erhalten.

Der Uterus ist das wichtigste Zielorgan des Progesterons. Nach vorhergehendem Östradioleinfluß fördert Progesteron das Wachstum des Myometriums, bewirkt in der Uterusschleimhaut, die unter Östrogeneinfluß aufgebaut worden ist, den drüsigen Umbau und verändert dort die Gefäßversorgung und den Glykogengehalt (49).

Durchschnittliche Sekretion von Progesteron in mg/d
Durchschnittliche Konzentration von Progesteron im
Serum in $\mu\text{g/l}$ (49)

	Sekretion (mg/d)	Konzentration ($\mu\text{g/l}$)
Proliferationsphase	4	0,3
Gelbkörperphase	30	15
Frühe Schwangerschaft	90	40
Späte Schwangerschaft	320	130
1 Tag nach der Entbindung		20

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurden kultivierte Gingiva- und Hautfibroblasten mit den Steroidhormonen Östradiol und Progesteron für 48 Stunden inkubiert und die Auswirkung auf die DNA-Synthese summarisch durch den Einbau radioaktiven Thymidins in die DNA verfolgt. Östradiol und Progesteron kamen isoliert und in Kombination zur Anwendung.

Bei alleiniger Gabe wurden für Östradiol Konzentrationen von 2,10, 15 und 20 $\mu\text{g/ml}$ verwendet, für Progesteron 5,20,40 und 50 $\mu\text{g/ml}$.

Bei den Kombinationsversuchen blieb die Östrogenkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ konstant, bei steigenden Progesteronkonzentrationen von 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$.

II. Allgemeine Kulturbedingungen

Kulturmedium

Als Kulturmedium diene Basal Medium Eagle (BME). Das Medium Eagle ist eine gepufferte isotonische Salzlösung, der essentielle Aminosäuren und Vitamine zugesetzt werden.

Das fötale Kälberserum enthält die für das Zellwachstum notwendigen makromolekularen Komponenten. Das verwendete Kulturmedium enthielt 10% fötales Kälberserum (FCS).

Zur Verhinderung des Bakterienwachstums setzt man dem Medium Antibiotika zu. Die Gebrauchsmenge der Antibiotikallösung betrug 1 ml/100 ml Medium.

Trypsin mit Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) verwendet man zum Ablösen der Fibroblasten. Zum Wachsen der Zellen bei Mediumwechsel diene Dulbeccos phosphatgepufferte Saline (PBS).

Zur radioaktiven Markierung der DNA wurde ^3H -Thymin verwendet. Die spezifische Radioaktivität für jede Versuchsreihe betrug 2 $\mu\text{Ci/ml}$.

Tabelle 1

Verwendete Lösungen

BME: BASAL MEDIUM EAGLE

BME-Mediumzusammensetzung (Mengen in mg/l)

EARLES's Salze

NaCl	6800	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200
KCl	400	MgCl ₂ ·6H ₂ O	---
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	---	CaCl ₂	200
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140	D-Glucose	1000
KH ₂ PO ₄	---	Phenolrot	10
L-Arginin HCl	21	Biotin	1
L-Cystin	12	Folsäure	1
L-Glutamin	292	Cholinchlorid	1
L-Histidin	8	Nicotinamid	1
L-Isobencin	26	D-Ca-Pantothenat	1
L-Leucin	26	Pyridoxal HCl	1
L-Lysin HCl	36,5	Thiamin HCl	1
L-Methionin	7,5	Riboflavin	0,1
L-Phenylalanin	16,5	i-Inosit	2
L-Threonin	24		
L-Tryptophan	4		
L-Tyrosin	18		
L-Valin	23,5		

Nichtessentielle Aminosäuren (NEA) Konzentratlösung

(100x)-mg/100 ml

L-Alanin	89
L-Asparagin H ₂ O	150
L-Asparaginsäure	133
L-Glutaminsäure	147
Glycin	75
L-Prolin	115
L-Serin	105

Trypsin/EDTA-Lösung (0,05/0,02%ig)

NaCl	8000
KCl	200
Na ₂ HPO ₄	1150
KH ₂ PO ₄	200
EDTA-Na ₂	200
Trypsin 1:250	500

200 ml BME + 4 ml Trypsin/EDTA Lösung

Antibiotika-Lösung

Penicillin/Streptomycin 10 000 E/10 000 µg/ml

gegen Gram-positive und Gram-negative Keime

Gebrauchsmenge der Antibiotika-Lösung 1 ml/100 ml Medium.

Fötales Kälberserum

getestet auf:

- Mykoplasmen
- bakterielle L-Formen
- Viruskontamination
- Virusantikörper (BVD-MD, IBR-IPV, PI3)

Hormone

Östradiol: 17- β Estradiol (Sigma E - 8875)

Progesteron: (Serva 33530)

Radioaktive Substanzen

^3H -Thymidin (Amersham)

(6 - ^3H) 5 Ci/mmol

Spezifische Radioaktivität der jeweiligen Versuchsreihen:

2 $\mu\text{Ci/ml}$ (25 ml Eagles Basal-Medium + 50 μl ^3H -Thymidin)

Die Zellen sind nach MARTIN (69) aus den Explantaten angezüchtet worden und in Eagles Basal-Medium, mit fötalem Kälberserum (10%), Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 $\mu\text{g/ml}$), gehalten worden.

Inkubiert wurde in einem Gemisch aus 95% Luft und 5% CO_2 bei 37°C. Für die nachfolgenden Versuchsreihen dienten Fibroblasten zwischen der 5. und 15. Passage.

III. Entnahme der Gewebeproben

a) Gingivagewebe

Die Gingivabiopsien stammten von Studenten der Zahnheilkunde beiderlei Geschlechts. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Gingiva keinerlei Entzündungszeichen zeigte. Um bei der Entnahme Keimfreiheit zu erzielen, spülten die Probanden die

Mundhöhle gründlich mit Chlorhexidinlösung. Die Biopsien wurden von der befestigten Gingiva distal der hinteren Molaren mit dem Skalpell abpräpariert und sofort in sterilen Glasfläschchen, gefüllt mit dem BME-Medium (Tabelle 1), gegeben und bei Raumtemperatur für ca. 1 Stunde aufbewahrt.

b) Hautgewebe

Um Hautfibroblasten zu gewinnen, wurden Biopsien aus dem Oberarm entnommen. Zur Desinfektion der Hautoberfläche diente eine 70%ige Alkohollösung. Nach Entnahme wurde die Biopsie in BME-Medium für ca. 1 Stunde aufbewahrt und anschließend wie folgt behandelt.

IV. Anlegen der Fibroblastenkulturen

a) Anzüchten der Fibroblastenkulturen

Die Gewebeproben wurden auf der sterilen Werkbank in kleine Stücke geschnitten und in sterile Petrischalen gegeben. Mit Hilfe eines Deckgläschens und autoklaviertem Silikonfett erfolgte eine Befestigung des Gewebes auf dem Boden des Kulturgefäßes. Das Gingivagewebe wurde anschließend mit 5 ml BME-Vollmedium und einem Zusatz von 10% FCS überschüttet und im Wärmeschränk bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% aufbewahrt. Nach einer Woche erfolgte der erste Mediumwechsel. Bereits nach wenigen Tagen konnte das An-

wachsen der oberflächlichen Epithelzellen beobachtet werden. Das Aussprossen der ersten Fibroblasten dauerte im Schnitt eine bis zwei Wochen.

b) Gewinnung von Fibroblastenmonolayer

Nach vier Wochen war es notwendig, die ausgewaschenen Fibroblasten abzulösen und auf neue Kulturgefäße zu verteilen. Dazu wurde das Deckgläschen entfernt und die Gewebeproben mit den bereits ausgewachsenen Fibroblasten mit Phosphatpuffer (PH 7,4) gewaschen.

Zum Ablösen der Fibroblasten diente pro Petrischale 2 ml Enzymlösung (0,025% Trypsin, 0,01% EDTA-Lösung PH 7,4).

Nach 3 Minuten konnte der Ablösevorgang im Mikroskop kontrolliert werden, wobei die Fibroblasten als kugelige Zellen zu erkennen waren.

Die Fibroblasten, die jetzt in 2 ml Enzymlösung suspendiert waren, wurden zu je 1 ml auf zwei große Kulturgefäße verteilt. Beide Kulturgefäße wurden anschließend mit 15 ml BME-Vollmedium überschichtet und wieder im Wärmeschränk aufbewahrt. Nach 25 Stunden mußte ein Mediumwechsel vorgenommen werden, um die noch vorhandene Enzymlösung zu entfernen. Die kugeligen Zellen begannen bereits am nächsten Tag sich am Boden des Kulturgefäßes anzuheften und ihre typische längliche Form wieder anzunehmen. Nach 5 bis 6 Tagen konnte man einen konfluenten Fibroblastenrasen unter dem Mikroskop beobachten (Abb.4).

Das Splitten der Fibroblastenkultur konnte 25 mal wiederholt werden. Nach dieser Zeit war eine deutliche Wachstums-
minderung als Folge eines Alterungsprozesses zu beobachten.
Für die folgenden Versuche wurden die Zellen zwischen der
fünften und fünfzehnten Teilungsrate verwendet. Für die
Versuchsreihe erfolgte ein Aufteilen der Fibroblasten in
kleine Petrischalen mit 10^5 Zellen. Die Zellzahl wurde
in der Zählkammer bestimmt.

V. Versuche mit den Sexualhormonen

Die Hormone wurden als Stocklösung in Propylenglykol ge-
löst und nach Zugabe von Basal Medium Eagle steril fil-
triert. Die Tabellen 2 und 3 geben die Versuchsanordnung
mit 17- β -Östradiol und mit Progesteron wieder.

Tabelle 2

Versuchsanordnung mit 17- β -Östradiol

(Stammlösung 20 $\mu\text{g/ml}$)

Versuch Nr.	Östradiollösung (ml)	BME (ml)	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)
1	0,5	4,5	2
2	2,5	2,5	10
3	3,75	1,25	15
4	5,0	-	20
5	-	5,0	Kontrolle
6	-	5,0	Kontrolle

Tabelle 3

Versuchsanordnung mit Progesteron

(Stammlösung 50 $\mu\text{g/ml}$)

Versuch Nr.	Progesteronlösung (ml)	BME (ml)	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)
1	0,5	4,5	5
2	2,0	3,0	20
3	4,0	1,0	40
4	5,0	-	50
5	-	5,0	Kontrolle
6	-	5,0	Kontrolle

a) Inkubation mit 17- β -Östradiol

Stammlösung:

6 ml Östradiollösung (1 mg Östradiol/ml Propylenglykol)

9 ml Propylenglykol

285 ml BME

3 ml FCS

$\hat{=}$ 20 μ g/ml Östradiol

Die Fibroblasten wurden nach Tab. 2 mit unterschiedlichen Konzentrationen Östradiol für 2 Tage inkubiert.

Dabei führten wir von den Haut- bzw. Gingivafibroblasten jeweils Doppelbestimmungen mit Kontrolluntersuchungen durch. Nach zwei Tagen mußten die Hormonmedien abpipettiert und die Fibroblasten mit ^3H -Thymidin (2 μ Ci/ml MBE) versetzt werden. Durch den Einbau der radioaktiven Substanz in die DNA der lebenden Zelle, konnte eine Analyse der Zellaktivität erfolgen.

b) Inkubation mit Progesteron

Stammlösung:

15 ml Progesteronlösung (1mg Progesteron/ml Propylenglykol)

285 ml BME

3 ml FCS

$\hat{=}$ 50 μ g/ml Progesteron

Die Zellen wurden nach Tab. 3 mit verschiedenen Konzentrationen von Progesteron für zwei Tage inkubiert. Der Vorgang erfolgte analog den Östradiolversuchen.

Am Ende der Versuchsreihe mit Progesteroninkubation erfolgte ebenfalls die Bestimmung der Zellaktivität mittels ^3H -Thymidineinbaues.

c) Wirkung beider Hormone in Kombination

Haut- bzw. Gingivafibroblasten wurden mit $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Östradiol und steigenden Konzentrationen von Progesteron (Tab.3) für 2 Tage inkubiert. Der Arbeitsvorgang lief entsprechend den Versuchen mit den isolierten Hormonen ab. Zur Bestimmung der Zellaktivität diente auch hier der Einbau von ^3H Thymidin.

Arbeitsvorgang zur Gewinnung und Messung der radioaktiven Substanzen in TCA-fällbares Material:

Nachdem die Fibroblasten 2 Stunden mit $2\mu\text{C/ml}$ ^3H -Thymidin inkubiert wurden, erfolgte ein sorgfältiges Abpipettieren des radioaktiven Mediums, anschließend ein gründliches waschen der Zellen mit PBS-Puffer um alle radioaktiven Reste zu entfernen. Diese Arbeitsschritte mußten rasch erfolgen, da die Zellen bis zu diesem Zeitpunkt noch aktiven Stoffwechsel betreiben. Das Übersichten der Fibroblasten mit 2 ml 7%igem TCA führte zu einem raschen Absterben der Zellen. Anschließend konnten die Fibroblasten vom Boden der Petrischalen abgelöst und auf Filterbänke überführt werden. Es erfolgte ein Nachwaschen des Zellmaterials mit 7%iger TCA-Lösung. Die Filterbänke wurden mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, mit 95%igem Äthanol gespült und getrocknet.

Die trockenen Filter wurden in Countergläschen gegeben und mit 10 ml Toluol versetzt. Die Zählung der Radioaktivität erfolgte für 10 Minuten in einem Packard-Tri-Card Gerät (Modell 544).

Auswertung eines Originalszintigramms

		o/o K
A=003233.6(2.0%)	) 3618	100
A=004002.6(1.5%)		
A=001994.8(3.0%)		55
A=000103.0(10%)		3
A=000061.0(15%)		2
<u>A=000078.6(15%)</u>		<u>2</u>
A=004609.2(1.5%)	) 4579	100
A=004548.2(1.5%)		
A=002683.8(2.0%)		59
A=000300.2(7.0%)		7
A=000108.0(10%)		2
<u>A=000101.8(10%)</u>		<u>2</u>
A=004493.0(1.5%)	) 4856	100
A=005222.2(1.5%)		
A=004003.4(1.5%)		82
A=000365.0(5.0%)		8
A=000096.0(10%)		2
A=000058.8(15%)		1

Tabelle 4

DNA-Gehalte der Gingivafibroblasten nach Zugabe von steigenden Östrogenkonzentrationen, gemessen in % der Kontrolle, bei einer Gesamtzahl von 6 Versuchen.

Konzentration von 17- β -Östradiol in $\mu\text{g/ml}$	DNA-Gehalte der Zelllinien in % der Kontrolle	$\bar{X} \pm \text{SEM}$
2	122,92,99,65,126,122	$105 \pm 8,8$
10	104,64,89,99,102,62,98,104	$90 \pm 5,8$
15	98,43,56,-,87,77,98	$77 \pm 8,46$
20	100,33,52,-,129,98,100	$85 \pm 13,3$

Tabelle 5

DNA-Gehalte der Gingivafibroblasten nach Zugabe von steigender Progesteronkonzentration, gemessen in % der Kontrolle, bei einer Gesamtzahl von 6 bis 8 Versuchen.

Konzentration von Progesteron in $\mu\text{g/ml}$	DNA-Gehalte der Zelllinie in % der Kontrolle	$\bar{X} \pm \text{SEM}$
5	70,72,75,77,-,122,65	$80 \pm 7,7$
20	10,18,12,15,7,5,16,9	$12 \pm 1,5$
40	10,8,5,4,-,1,2	$5 \pm 1,3$
50	24,7,3,6,-,0,14	$9 \pm 3,2$

Tabelle 6

DNA-Gehalte der Gingivafibroblasten nach Zugabe von 10 µg/ml Östradiol und steigender Konzentration von Progesteron, gemessen in % der Kontrolle, bei einer Gesamtzahl von 5 bis 6 Versuchsreihen.

Konzentration von Progesteron in µg/ml	DNA-Gehalte der Zelllinie in % der Kontrolle	X ± SEM
5	17,25,19,8,11	16 ± 9,9
10	12,12,20,4,6,9	10,8 ± 2,1
15	10,12,15,4,3,9	8,8 ± 1,7
20	12,12,15,4,6,3	8,3 ± 3,4

Tabelle 7

DNA-Gehalte der Hautfibroblasten nach Zugabe von steigenden Östrogenkonzentrationen, gemessen in % der Kontrolle, bei einer Gesamtzahl von 7 Versuchen

Konzentration von Östradiol in µg/ml	DNA-Gehalte der Zelllinie in % der Kontrolle	X ± SEM
2	127,199,89,115,56,37,23	92 ± 21
10	161,198,68,90,81,59,45	100 ± 19,9
15	142,188,57,74,79,24,28	85 ± 21
20	153,170,57,72,38,150,30	95 ± 21

Tabelle 8

DNA-Gehalte der Hautfibroblasten nach Zugabe von steigender Progesteronkonzentration, gemessen in % der Kontrolle, bei einer Gesamtzahl von 7 Versuchen

Konzentration von Progesteron in $\mu\text{g/ml}$	DNA-Gehalt der Zelllinie in % der Kontrolle	$\bar{X} \pm \text{SEM}$
5	147,179,56,70,121,80,123	$111 \pm 15,5$
20	59,41,17,23,81,39,89	$50 \pm 9,7$
40	3,12,4,2,24,25,72	$20 \pm 8,6$
50	4,10,3,3,16,31,43	$16 \pm 5,5$

Tabelle 9

DNA-Gehalte der Hautfibroblasten nach Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ Östradiol und steigender Konzentration von Progesteron, gemessen in % der Kontrolle, bei einer Gesamtzahl von 7 Versuchen.

Konzentration von Progesteron in $\mu\text{g/ml}$	DNA-Gehalt der Zelllinie in % der Kontrolle	$\bar{X} \pm \text{SEM}$
5	17,19,29,85,55,59,82	$58 \pm 9,9$
10	11,14,42,3,7,8	$14 \pm 5,3$
15	13,12,9,3,2,2,2	$6 \pm 1,8$
20	10,9,6,3,2,2,1	$5 \pm 1,3$

C. Ergebnisse der Versuchsreihen

I. Einfluß von Östradiol

a) Wirkung auf Gingivafibroblasten

Unterschiedliche Konzentrationen von Östradiol, entsprechend den physiologischen Werten in Blut und Speichel wurden zu den Fibroblastenkulturen gegeben. Die DNA-Synthese, gemessen durch den Einbau von ^3H -Thymidin, zeigte bei allen Östradiolkonzentrationen geringfügig schwankende Werte. Die DNA-Synthese konnte auch durch höhere Hormonkonzentrationen nicht beeinflußt werden. Die Werte lagen im statistischen Schwankungsbereich. Tab. 4 und Abb.1 zeigen den DNA-Gehalt bzw. die DNA-Synthese, gemessen in % der Kontrolle.

In Abb. 5 ist das Wachstumsmuster der Gingivafibroblastenkultur nach Östrogeneinfluß photographisch festgehalten.

b) Wirkung auf Hautfibroblasten

Tab. 7 gibt den DNA-Gehalt der Hautfibroblasten, gemessen in % der Kontrolle, wieder. Bei Östradiolkonzentrationen im Bereich von 2 - 20 $\mu\text{g/ml}$ konnte keine Wirkung auf die DNA-Synthese gemessen werden (Abb.1).

II. Einfluß von Progesteron

a) Wirkung auf Gingivafibroblasten

Progesteronkonzentrationen von 5-50 $\mu\text{g/ml}$ wurden in den Versuchsreihen verwendet. In Tab. 5 findet man, den jeweiligen Progesteronkonzentrationen zugeordnet, den DNA-Gehalt der Zelllinien, gemessen in % der Kontrolle.

Gingivafibroblasten zeigen bereits bei geringen Konzentrationen von 5 µg/ml Progesteron eine steile Abnahme der DNA-Synthese (Abb. 2). Die sinkende Syntheseleistung der Zellen konnte auch photographisch dokumentiert werden (Abb. 6).

b) Wirkung auf Hautfibroblasten

Hautfibroblasten, inkubiert mit Progesteronkonzentrationen von 5 - 50 µg/ml, zeigten ebenfalls eine fallende DNA-Syntheseleistung. Die Wirkung des Progesterons war jedoch bei den Hautfibroblasten deutlich schwächer ausgeprägt als bei den Gingivafibroblasten (Tab. 8, Abb. 2).

III. Einfluß der Hormone Östradiol und Progesteron in Kombination

a) Wirkung auf Gingivafibroblasten

Bei einer konstanten Östradiolkonzentration von 10 µg/ml wurden Progesteronkonzentrationen zwischen 5 - 20 µg/ml verwendet. Die Gingivafibroblasten reagierten bei sehr geringen Progesteronmengen mit einer Verminderung der DNA-Synthese (Tab. 6, Abb. und Abb.7).

Die Hormonwirkung setzte früher ein als bei alleiniger Progesteroninkubation.

b) Wirkung auf Hautfibroblasten

Die Hautfibroblasten reagierten gleichfalls bei bereits 5 µg/ml Progesteron mit einer Zellteilungsreduktion. Der Abfall der DNA-Syntheseleistung war bei den Hautfibroblasten nicht so deutlich wie bei den Gingivafibroblasten (Tab. 9, Abb. 3).

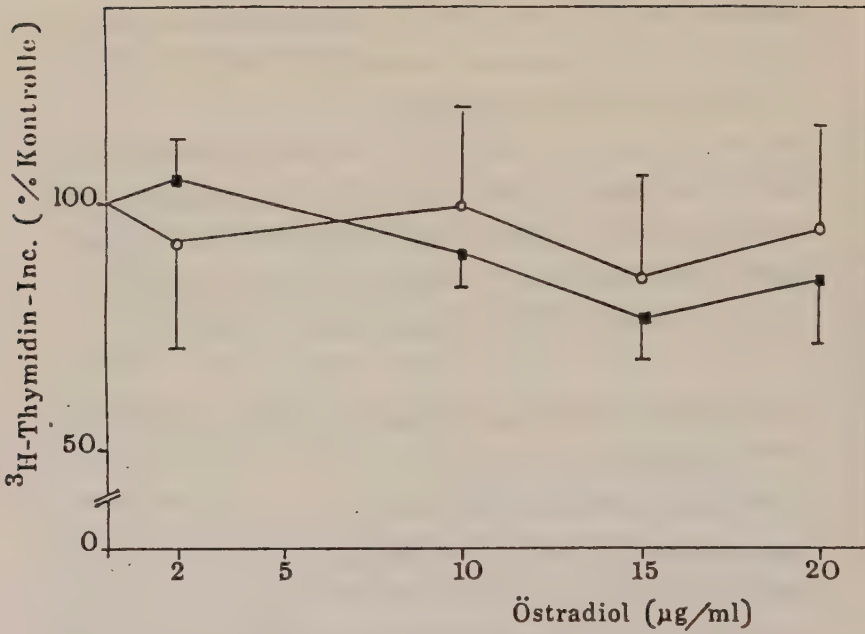


Abb. 1:

DNA-Synthese, bestimmt durch ^3H -Thymidineinbau, in Gingiva- (■) und Hautfibroblasten (○), nach Präinkubation mit Östradiol für 2 Tage. Die Werte entsprechen Mittelwerten $\pm$ SEM (n=7).

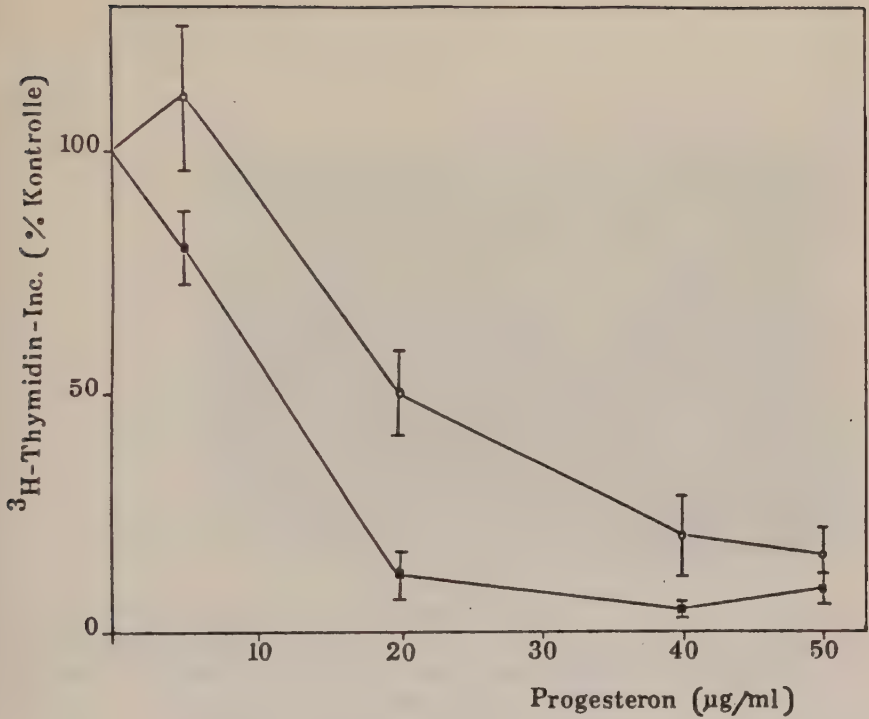


Abb. 2:

DNA-Synthese, bestimmt durch ^3H -Thymidineinbau, in Gingiva- (●) und Hautfibroblasten (○), nach Präinkubation mit Progesteron für 2 Tage. Die Werte entsprechen Mittelwerten $\pm$ SEM (n=7).

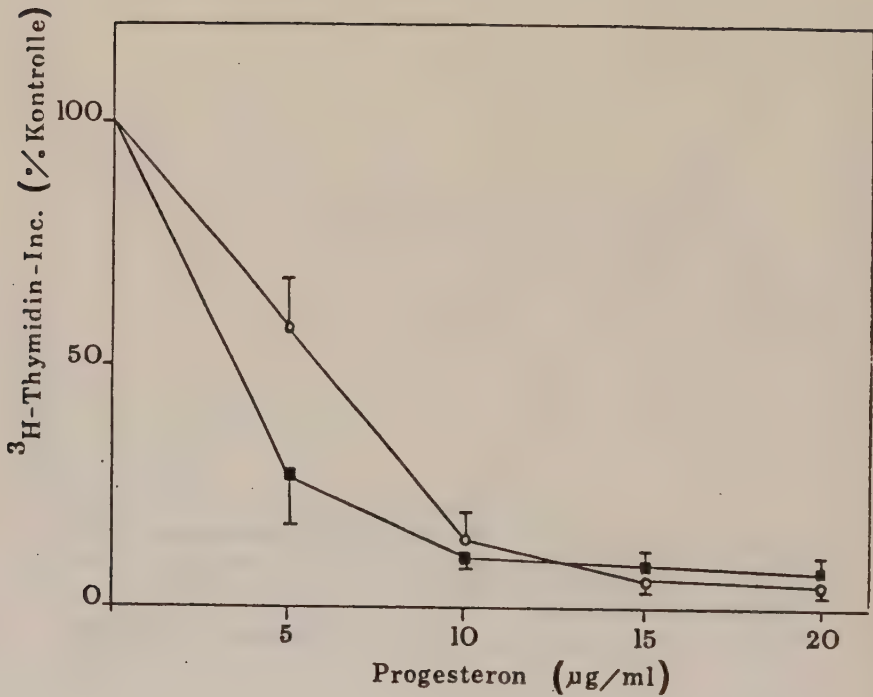


Abb. 3:

DNA-Synthese, bestimmt durch ^3H -Thymidineinbau, in Gingiva- (■) und Hautfibroblasten (○), nach Präinkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Östradiol und steigenden Konzentrationen von Progesteron. Die Werte entsprechen Mittelwerten $\pm$ SEM (n=7).

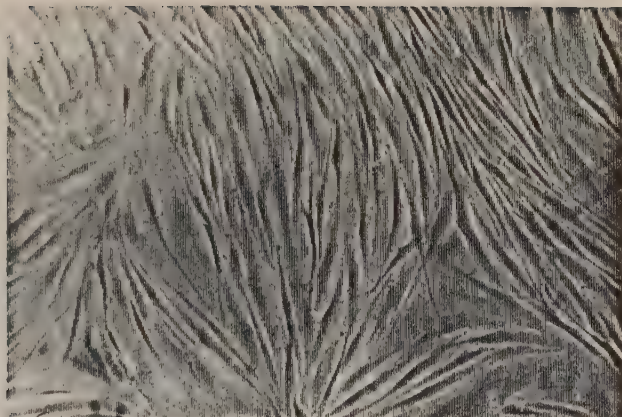


Abb. 4:

Gingivafibroblasten nach der 5. Passage, die Fibroblasten zeigen einen dichten Rasen und bilden einen Monolayer. Vergrößerung 125-fach, Phasenkontrastaufnahme.

Gingivafibroblastenkulturen zeigen je nach Hormonkonzentration unterschiedliche Wachstumsmuster

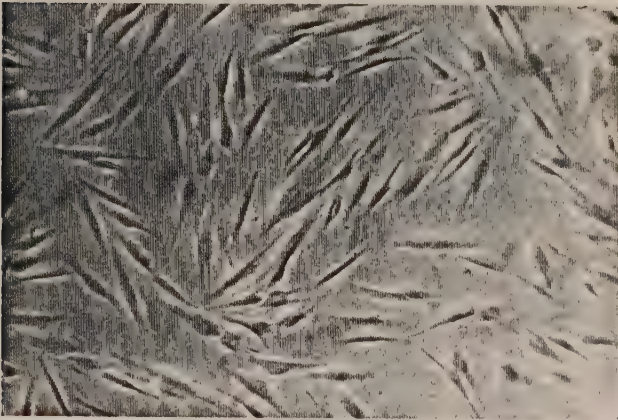


Abb. 5:

Gingivafibroblasten unter 17- β -Östradioleinwirkung.

2 Tage mit 15 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert.

Vergrößerung 125-fach, Phasenkontrastaufnahme.

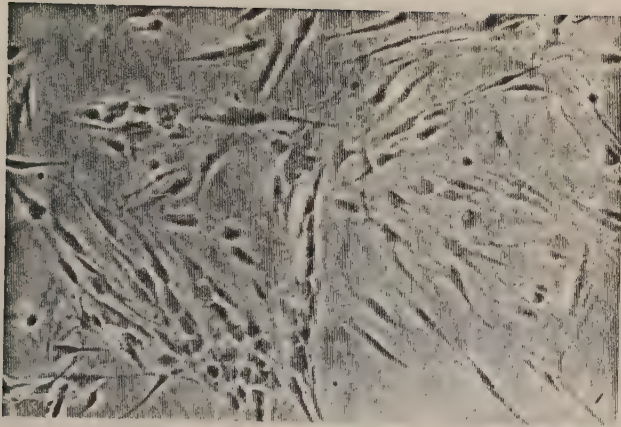


Abb. 6:

Gingivafibroblastenkulturen unter Progesteroneinwirkung.
Bei Zugabe von 40 $\mu\text{g/ml}$ Progesteron für 2 Tage, ist
eine deutliche Wachstumsreduktion zu erkennen.
Vergrößerung 125-fach, Phasenkontrastaufnahme.



Abb. 7:

Gingivafibroblasten unter 17- β -Östradiol- und Progesteroneinwirkung.

Die Fibroblastenkultur nach 2 Tagen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Östradiol und 20 $\mu\text{g/ml}$ Progesteron. Die verminderte Zellteilungsrate ist gut zu erkennen.

Vergrößerung 125-fach, Phasenkontrastaufnahme.

D. KRITISCHE SCHLUSSBETRACHTUNGEN

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Hormone Östradiol und Progesteron an einem bisher noch nicht berichteten Modell, nämlich an Gingiva- und Hautfibroblastenkulturen, geprüft.

Es erfolgten in vitro-Experimente mit kultivierten Fibroblasten aus menschlichen Haut- und Gingivabiopsien. Deren Reaktion auf Östradiol und Progesteron wurde anhand der DNA-Syntheseleistung untersucht.

Nach Inkubation der Fibroblasten mit unterschiedlichen Konzentrationen der weiblichen Sexualhormone Östradiol und Progesteron, nach Bestimmung der DNA-Syntheseleistung mittels ^3H -Thymidin Einbaus und nach Berechnung des DNA-Gehaltes in % der Kontrolle, lassen sich folgende Aussagen treffen:

Es konnte ein Unterschied in der Wirkung beider Hormone festgestellt werden.

Östradiol alleine ließ bei beiden Zellarten nur einen geringen Einfluß erkennen. Sowohl Haut-, als auch Gingivafibroblasten zeigten bei Östradiolkonzentrationen von 10 und 15 $\mu\text{g/ml}$ eine geringe Verminderung der DNA-Synthese. Im Konzentrationsbereich unter 10 $\mu\text{g/ml}$ und über 20 $\mu\text{g/ml}$ kommt es zu einer kleinen Erhöhung der DNA-Syntheseleistung.

Progesteron, beigegeben in den Konzentrationen von 5-50 $\mu\text{g/ml}$, bewirkt eine deutliche Verminderung der DNA-Synthese bei beiden Fibroblastentypen.

Gibt man zu Progesteron (5-20 µg/ml) 10 µg/ml Östradiol, reagieren die Zellen mit einem steilen, im Vergleich zur isolierten Progesteronwirkung verstärkten Abnahme der DNA-Syntheseleistung.

Diese synergistische Wirkung wird auch von HARNDT (19) und MESTER (39) angegeben.

Bei allen Versuchsreihen erwiesen sich die Gingivafibroblasten als das empfindlichere System.

Die Ergebnisse bestätigen, daß die Gingiva besonders gut auf exogene Reize und endogene Einflüsse reagiert. Die Verminderung der DNA-Synthese hat eine Reduktion der Regenerationsfähigkeit der Zellen zur Folge, die sich in einer erhöhten Entzündungsbereitschaft äußern kann. Die Messung der DNA-Syntheseleistung nach dem Hormonstimulans, läßt keine Rückschlüsse auf den Angriffsort und auf den Wirkungsmechanismus der Steroide zu.

Vergleichende Hormonuntersuchungen mit menschlichen Haut- und Gingivafibroblastenkulturen liegen zur Zeit nicht vor. Eine Bestätigung der vorliegenden Resultate durch andere Autoren ist daher nicht möglich. Die Ergebnisse lassen jedoch in Übereinstimmung mit der Literatur (2,4,8,9,10,11,13,14,16,17,28,44,48) den Schluß zu, daß weibliche Geschlechtshormone, in Konzentrationen wie sie während der Schwangerschaft vorkommen, die Entzündungsreaktion parodontaler Gewebe mitbeeinflussen.

Nach den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit ist die Änderung der DNA-Synthese nach Zugabe der Steroidhormone Östradiol und Progesteron als ein auf zellulärer Ebene mitbestimmender Faktor in diesem Regulationsmechanismus anzusehen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Schwangerschaftsbedingte Veränderungen der Gingiva wurden von vielen Autoren beobachtet. Als Ursachen sind sowohl primäre lokale Reize, wie bakterielle Plaque und Zahnstein als auch die hormonelle Umstellung anzusehen, die sich in der zweiten Hälfte der Gravidität besonders stark auswirkt. Die durch die Placenta gebildeten Hormone führen zu einer Permeabilitätsveränderung der Gefäße, zu einer Auflockerung des Bindegewebes und damit zu einer erhöhten Entzündungsbereitschaft des Parodonts.

Das in Vitro-System der Fibroblastenkulturen diente in der vorliegenden Arbeit als Modell, um die Wirkung der weiblichen Geschlechtshormone Östradiol und Progesteron auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Dabei fand eine Gegenüberstellung von Haut- und Gingivafibroblasten statt. Beide Zelltypen menschlichen Ursprungs wurden mit Östradiolkonzentrationen von 2 bis 20 µg/ml und Progesteronkonzentration von 5 bis 50 µg/ml für zwei Tage inkubiert und die DNA-Syntheseleistung der Zellen durch ³H-Thymidineinbau bestimmt. Der DNA-Gehalt der Zellen wurde in Prozent zur Kontrolle berechnet.

1. Die Östradiolkonzentrationen von 2 bis 20 µg/ml hatten bei beiden Zelltypen keinen signifikanten Einfluß auf die DNA-Synthese. Bei allen Versuchsreihen ist der DNA-Gehalt, gemessen in Prozent der Kontrolle, relativ hoch.

Die Östradiolkonzentrationen von 15 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ bewirkten eine geringfügige Reduktion der DNA-Synthese. Beim Vergleich Haut- und Gingivafibroblasten fällt auf, daß die Hautfibroblasten weniger empfindlich reagieren.

2. Progesteron bewirkt bereits bei niedrigen Konzentrationen von 5 $\mu\text{g/ml}$ eine Verminderung der DNA-Synthese, die bis zur Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ stetig abnimmt.

3. Läßt man beide Hormone zusammen einwirken, ist eine rasche und deutliche Zellantwort die Folge. Bei einer konstanten Östradiolkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ und steigender Progesteronkonzentration von 5 bis 20 $\mu\text{g/ml}$ ist die DNA-Syntheseleistung im Vergleich zur isolierten Progesteronwirkung nochmals deutlicher reduziert. Bei allen Versuchsreihen erwiesen sich die Gingivafibroblasten als das empfindlichere System.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen insgesamt erkennen, daß bei höherem Hormonspiegel die Fibroblasten mit einer Reduktion der DNA-Synthese reagieren.

Literatur

1. Abderhalden, R.:
Die Hormone
Springer, Berlin 1952
2. Allerbeck, Schlegel, Triadan:
Zum Zusammenhang zwischen Biß- und Parodontal-
befunden bei Schwangeren unter besonderer Be-
rücksichtigung hyperplastischer Parodontopathien
Forum Parodont 10, 2, 813-825 (1960)
3. Angelopoulos, A.P.:
Studies of mast cells in the human gingiva
J Periodont Res 8, 28-36 (1973)
4. Arkovy, J.:
Über Gingivitis gravidarum und Gingivitis periodica
Öst ung Vjschr Zahnheilk 31, 197-203 (1915)
5. Bachmann, K.:
Biologie für Mediziner
Springer, Berlin (1976)
6. Bauer, K.F.:
Methodik der Zell- und Gewebezüchtung
S. Hirzel, Stuttgart (1974)
7. Bethmann, W.:
Hormone und Mundhöhle
Volk und Gesundheit, Berlin (1961)
8. Birò, S.:
Untersuchungen über den Einfluß der Gravidität
auf die Caries der Zähne
Öst ung Vjschr Zahnheilk 14, 371-391 (1898)

9. Bocskay, J., Wiener, F., Monia, A., Dengelegi, T.:
Einige histologische und histochemische Aspekte
der Gingivitis gravidarum
Öst Z Stomat 66, 66-71 (1970)
10. Bruszt, P., Bónóczy, J.:
Über die Häufigkeit der Schwangerschaftsgingivitis
Dtsch Zahnärztl Z 28, 1101-1104 (1973)
11. Cohen, W.D., Friedman, L., Shapiro, J., Kyle, C.G.:
A longitudinal investigation of the periodontal
changes during pregnancy
J Periodont 40, 563-570 (1969)
A longitudinal investigation of the periodontal
changes during pregnancy and fifteen month post partum
J Periodont 42, 653-657 (1971)
12. Diezfalusy, E., Lauritzen, C.:
Östrogene beim Menschen
Springer, Berling 1961
13. Feile, S., Mehring, B.:
Zahnfleischveränderungen in der Schwangerschaft
Med Diss Giessen 1976
14. Fessler, A.:
Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen über
den Einfluß weiblicher Geschlechtshormone - besonders
der Ovulationshemmer auf das marginale Parodontium
Habilschrift, Mainz 1974
15. Franke, J.:
Über die Struktur und Funktion der Endstrombahn bei
parodontalen Erkrankungen
Dtsch Zahnärztl Z 19, 177-192 (1964)

16. Gridly, M.S.:
Gingival condition in pregnant women. A report on
the examination of the gingiva of 1002 pregnant women
Oral Surg 7, 641-646 (1954)
17. Haim, G.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Hyper-
plasia gingivae gravidarum
Dtsch Zahn Mund Kieferheilk 50, 121-136 (1968)
18. Harndt, E.:
Parodontitis und Parodontose
Karl-Hanser, München 1950
19. Harndt, R.:
Über das Follikelhormon und das Corpus luteum Hormon
in ihrem Einfluß auf die Mundhöhle
Forum Parodont 3, 961-963 (1952)
20. Heidemann, D., Lampert, F.:
Menschliche Gingiva in der Zellkultur
Dtsch Zahnärztl Z 35, 430-433 (1980)
21. Holm-Pedersen, P., Løe, H.:
Flow of gingival exudate as related to menstruation
and pregnancy
J Periodont Res 2, 13-20 (1967)
22. Huber, H.:
Zahnfleischerkrankungen in der Schwangerschaft
Zbl Gynäk 62, 1977-1980 (1938)
23. Hugosson, A.:
Gingivitis in pregnant women.
A longitudinal clinical study
Odont. Revy 22, 65-84 (1971)

24. Hugosson, A.:
Gingival inflammation and female sex hormones
A clinical investigation of pregnant women
and experimental studies of dogs
J Periodont Res 5, 4-18 (1970)
25. Klein, H.:
Veränderungen der Mundhöhle während der Schwangerschaft
Med Diss Würzburg 1956
26. Klinger, G.:
Die Sulkus-Fluid-Fließrate in Abhängigkeit von hormo-
nellen Einflüssen.
Stomat DDR 32, 53-55 (1982)
27. Künzel, W., Klimm, W., Ihl, I.:
Zur prophylaktischen Beeinflussung gingivaler
Veränderungen während der Schwangerschaft
Schweiz Mschr Zahnheilk 80, 1098-1104 (1970)
28. Kutzleb, H.J.:
Das Follikelhormon und sein Einfluß auf die Mundhöhle
Forum Parodont. 11, 1277-1282 (1951)
Corpus- luteum Hormon und sein Einfluß auf die Mundhöhle
Forum Parodont 1, 231-236 (1952)
29. Lange, E.D.:
Parodontologie in der täglichen Praxis
Thieme, Stuttgart 1983
30. Lange, E.D.:
Vergleichende histologische und zytologische Unter-
suchungen am menschlichen Gingivalsaum
Dtsch Zahnärztl Z 20, 1035-1045 (1965)

31. Leonhard, H.:
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen
Thieme, Stuttgart 1974
32. Lindhe, J., Branemark, P.:
Changes in mikrocirkulation after lokal applikation
of sex hormones
J Periodont Res 2, 185-193 (1967)
33. Lindhe, J., Björn, A.:
Influence of hormonal contraceptives on gingiva of women
J Periodont Res 2, 1-6 (1967)
34. Loe, H.:
Periodontal changes in pregnancy
J Periodont Res 36, 209-217 (1965)
35. Loe, H., Silness, J.:
Periodontal disease in pregnancy, prevalence
and severity
Acta Odont Scand 21, 533-551 (1963)
36. Maier, A.W., Orban, B.:
Gingivitis in pregnancy
Oral Surg 2, 334-551 (1949)
37. Martin, G.M.:
Human skin fibroblast. Methods and applications
tissue culture
Kruse and Petterson, Academic press, New York 1973
38. Mathis, H.:
Gibt es ein einfaches diagnostisches Mittel zur Korre-
lation gingivaler Abänderungen mit Zyklusstörungen?
Dtsch Zahn Mund Kieferheilk 16, 468-472 (1952)

39. Mester, J., Baulieu, E.E.:
Effects of progesterone: synergy and antagonism
with oestrogens
TIBS 2, 56-59 (1984)
40. Mittermayer, Ch., Kaden, P., Härle, F.:
Alterung von menschlichen Gingivafibroblasten in
der Zellkultur
Dtsch Zahnärztl Z 33, 777-780 (1978)
41. Mühlemann, H.R.:
Das weibliche Parodont unter dem Einfluß geschlechts-
spezifischer Hormone
Stoma (Heidelb) 5, 3-21 (1952)
42. Paul, J.:
Zell- und Gewebekulturen
Gruyter, Berlin, New York, 1980
43. Pinard, A., Pinard, D.:
Treatment of gingivitis of puerperal woman
Dent Cosmos 19, 327-328 (1877)
44. Rateitschak, K.H., Renggli, H., Mühlemann, H.R.:
Parodontologie
Thieme, Stuttgart 1978
45. Rateitschak, K.H., und E.M., Wolf, H.F.:
Farbatlant der Zahnmedizin
1 Parodontologie Thieme, Stuttgart, New York, 1984
46. Salden, H.R.:
Das Verhalten des Zahnfleisches während der
Schwangerschaft
Med. Diss Köln 1956

47. Schmidt, H.R.:
Menstruation, Schwangerschaft und Zahnfleischblutungen
Vjsch Zahnheilk 435-445 (1927)
48. Schlegel, D.:
Besonderheiten bei peripheren Parodontalgranulomen
Dtsch Zahnärztl Z 15, 368-371 (1960)
49. Schlegel, D., Triadan, H.:
Zur Stellung gingivaler Schwangerschaftshyperplasien
im System der Kiefergranulome
Stoma 13, 193-203 (1960)
50. Silbernagel, S., Despopoulos, A.:
Taschenatlas der Physiologie
Thieme, Stuttgart, 1978
51. Silness, J., Løe, H.:
Periodontal disease in pregnancy III
Respons to lokal treatment
Akta Odont Scand 24, 746-756 (1966)
52. Tammoscheit, U.G.:
Das Marginale Parodont während der Schwangerschaft
Dtsch Zahnärztl Z 17, 1501-1508 (1962)
53. Thlila, J.:
Epulis Gravidarum
Zahnärztl Prax 13, 288 (1962)
54. Träger, L.:
Steroidhormone: Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung
Springer, Berlin, 1977

55. Triadan, H.;
Hyperplastische Parodontopathien
Dtsch Zahnärztl Z 15, 363-368 (1960)
56. Turesky, S., Fischer, B. Glückmann, J.:
A histochemical study of the attached gingiva
in pregnancy
J Dent Res 37, 115-122 (1958)
57. Vossenbergh, G.:
Besteht ein Zusammenhang zwischen Erkrankungen
im Zahn-, Mund- und Kieferbereich und Schwangerschaft
Med Diss Düsseldorf, 1956
58. Wetzell, F.
Gingivitis gravidarum und innere Sekretion
Dtsch Zahnärztl Wschr 38, 796-799 (1935)
59. Wilken, J.:
Studien über klinische Erhebungen der patholo-
gisch veränderten Gingiva in der Schwangerschaft
Zahnärztl Prax 18, 41-43 (1967)
60. Ziskin, D., Blakberg, S., Stout, A.:
The gingiva during pregnancy. An experimental
study and a histopatological interpretation
Surg Gyn Obstst 57, 719-726 (1933)
61. Zitka, E.:
Veränderungen der weiblichen Mundschleimhaut im
Zusammenhang mit der Funktion der Keimdrüse
Öst Z Stomat 57, 303-312 (1960)

